



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

REC'D 30 MAR 2004

WIPO

PCT

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0037994
Application Number

출원년월일 : 2003년 06월 12일
Date of Application JUN 12, 2003

출원인 : 박원봉 외 1명
Applicant(s) PARK WON BONG, et al.

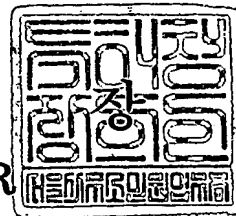
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2004 년 03 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.12
【발명의 명칭】	렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물
【발명의 영문명칭】	A composition for an enteric coating of natural product containing lectin
【출원인】	
【성명】	박원봉
【출원인코드】	4-2000-032207-1
【출원인】	
【성명】	유수연
【출원인코드】	4-2003-022464-2
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2000-038624-6
【포괄위임등록번호】	2003-040638-1
【발명자】	
【성명】	박원봉
【출원인코드】	4-2000-032207-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유수연
【성명의 영문표기】	LYU, Su-Yun
【주민등록번호】	770920-2012624
【우편번호】	139-240
【주소】	서울특별시 노원구 공릉동 593-24
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	16	면	16,000	원
---------	----	---	--------	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	5	항	269,000	원
---------	---	---	---------	---

【합계】	314,000	원		
------	---------	---	--	--

【감면사유】	개인 (70%감면)			
--------	------------	--	--	--

【감면후 수수료】	94,200	원		
-----------	--------	---	--	--

【요약서】**【요약】**

본 발명은 겨우살이를 비롯한 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여, 장용성 코팅제제를 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 렉틴을 주성분으로 하여, 장용성 마이크로캡슐을 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공한다.

위장관 내 환경에서 불안정하여 경구 투여하기 어려운 겨우살이 및 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여 장용성 제제를 제조함으로써, 약효성분의 생체이용률을 높이고 치료효과도 높일 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

겨우살이, 렉틴, 장용성, 마이크로캡슐

【명세서】

【발명의 명칭】

렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물 {A composition for an enteric coating of natural product containing lectin}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 표면구조를 나타낸 사진이다.

도 2는 겨우살이 렉틴이 함유된 알긴산염 이중 마이크로캡슐로부터 렉틴의 용출률을 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <3> 본 발명은 겨우살이를 비롯한 렉틴이 함유된 천연물을 대상으로, 장용성 코팅제제를 제조할 수 있는 효과적인 코팅용 조성물을 제공한다.
- <4> 또한 본 발명은 렉틴을 주성분으로 하여, 장용성 마이크로캡슐을 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공한다.
- <5> 렉틴(Lectin)은 겨우살이, 산수유, 달맞이꽃, 강낭콩, 완두콩, 맥문동, 목단, 상륙, 모과, 작약, 찌리, 토당귀, 담쟁이, 명아주, 팔루근, 표고버섯, 반하, 회양목, 아카시아 등 각종 식물과 별불가사리, 백합조개, 미꾸라지 등의 각종 해양천연물에 널리 분포되어 있다. 현재, 상당수의 렉틴이 상품화되어 있으며, concanavalin A (Con A)나 강낭콩 렉틴(PHA), ricin, abrin 등은 여러 연구에 자주 사용된다. 렉틴은 당과 결합하는 단백질 또는 당단백질로 한 분자 내에

당과 결합부위를 두 개 이상 갖고 있으며, 혈구응집성 물질로서 적혈구 등 여러 세포를 응집시키고, 당화합물을 침전시킨다. 따라서 렉틴 성분은 생물화학적 및 면역학적 성질이 매우 다양하여 질병의 치료, 진단 및 생명과학 연구 도구 등으로 많이 사용되고 있는 물질이다(Chung 등 약학회지 40(4): 387-393, 1996).

- 6> 렉틴이 지니는 역할 중에서도 면역학적, 생물화학적 측면에서 중요시되고 있는 특성으로는 종양세포의 선택적 응집능력, 사람의 혈액에 대한 특이성, 휴지기상태의 림프구를 자극 분열시키는 마이트젠 활성(mitogenic activity) 등을 들 수 있다. 2~6개의 당결합부위를 갖는 렉틴은 B-chain (binding chain)이 세포 표면의 수용체(특정 탄수화물)에 결합하면 A-chain (active chain)이 세포 내부로 침투하여 진핵세포의 리보솜(ribosomes)을 불활성화시켜서 단백질 합성을 저해시켜 활성을 나타낸다. 또한, B-chain의 세포막 표면의 특정 탄수화물과의 결합력은 항원과 항체의 친화력과 비슷하며, 이같은 렉틴의 결합특이성은 면역조절이나 항암효과에도 직접적인 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 정상적인 림프구에서와는 달리, 암성변화가 일어난 림프암 세포에서는 렉틴에 의해 응집반응이 일어난다는 사실이 보고되었으며, 이같은 사실은, 암성변화에 따른 세포막 구조의 변화를 연구하는데 렉틴이 이용될 수 있다는 배경이 되었다. 또한 렉틴을 림프구에 주었을 때, 이미 분화가 다 된 림프구가 임파아구(lymphoblast)로 변하면서 분열증식하는 현상이 관찰되었다.

- 7> 렉틴이 갖는 다양한 생리활성 가운데 인체 내 면역반응에 관계되는 몇 가지

내용을 보면, 우선 림프구에 대한 마이트젠으로서의 역할이다. 렉틴은 그 종류에 따라 T 또는 B 세포를 자극 분열시키며, 그 기전은 T 세포의 경우 렉틴이 대식세포를 자극함으로써 분비되는 인터류킨-1 (interleukin-1, IL-1)이 보조 T 세포를 활성화시키고, 이에 따라 IL-2가 작용하여 T 세포가 증식되며, B 세포의 경우 렉틴이 직접 작용하여 증식되거나, 혹은 보조 T 세포에 의해 유리되는 인터페론- γ (interferon- γ , IFN- γ), IL-4, IL-5, IL-6 등의 영향으로 증식되어지는 것으로 알려져 있다.

- <8> 다음으로는 항 종양작용을 들 수 있다. 종양세포 항원으로 조작한 단세포군 항체에 렉틴을 작용시켰을 때 종양 세포의 단백질합성이 저해되어 성장이 저해되며(Vieta 등, Science 219, 644, 1983), 대식세포나 다형핵 백혈구가 렉틴 존재 하에서 종양세포를 용해시켜 항 종양효과를 나타내는 등의 보고가 있다(Ohkuma 등, Cancer Res. 45, 4397, 1985). 또한, T 세포, 혹은 대식세포에 렉틴을 적용하여 이들 세포들로부터 유리되는 사이토킨 (IFN- γ , IL-2, TNF- α)에 의해 항암효과를 나타내는 기전 등이 보고되고 있다 (Tamura 등, FEBS Lett. 175, 325-328, 1984).
- <9> 그 외에 렉틴의 인슐린 유사효과(insulinomimetic activity)를 들 수 있다. 렉틴이 지방세포(adipocyte)의 인슐린 수용체(insulin receptor)에 결합하여 당 수송과 대사를 촉진, 지방합성(lipogenesis)과 피루베이트 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase) 활성촉진, 글리코겐(glycogen) 합성과 Mg-ATPase 활성촉진, 지방분해(lipolysis) 억제와 아데닐사이클라아제(adenylcyclase)의 활성저해 등을 일으키는 것 등이 보고되고 있다(Suya 등, J. Biochem. 92, 1251-1257, 1982).
- <10> 이상과 같이 천연물에 널리 분포되어있는 렉틴은 다양한 생리활성을 갖고 있음에도 불구하고 경구 투여 시 렉틴단백질은 소장에서 신속하게 아미노산으로 분해된 후, 전신 순환계로 흡수되

기 때문에 효능이 거의 상실된다 (Pusztai A. Lectins. Toxicants in plant origin, Vol III, 1987).

- <1> 렉틴이 함유된 천연물 중 겨우살이 (*Viscum album*)는 오래 전부터 암치료제로 사용되어 왔으며 부작용이 거의 없으면서 우수한 항암효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다(Hajto 등, Cancer Research 50:3322-3326, 1990. Jassen 등 Drug Research 43(11) 1221-1227, 1993., Am. Soc. for Biochem. and Molc. Biol. 267(33)23722- 23727, 1992). 이 식물은 직접적인 암세포의 살해 및 면역활성화 등의 복합작용에 의하여 효과를 발휘하는데, 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하며, 대식세포 및 자연살해(natural killer, NK)세포의 활성을 증가시켜 종양세포의 성장을 억제하고, 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Jassen 등, Drug Research 43(11) 1221-1227, 1993).
- <12> 이 식물에는 렉틴(분자량 60 kD정도), 비스코톡신(viscotoxin), 다당류 등 각종 활성성분이 함유되어 있는데, 항암활성에 가장 중요한 성분은 렉틴이다 (Bussing 등, Cancer Lett. 94: 199-205, 1995., Cancer Lett. 99: 59-72, 1996., Jung 등. Cancer Letters 51:103-108, 1990). 항암제에 의한 항암효과는 암세포의 비정상적인 증식을 억제하거나 암세포를 죽음으로 유도함으로써 나타난다. 겨우살이의 암세포와 백혈구세포에 대한 강력한 세포독성효과는 아포토시스(apoptosis)의 유도의 결과이며, 겨우살이 성분 중, 렉틴(lectin)만이 아포토시스에 의한 살해과정을 유도했다고 보고된 바 있다 (Bussing 등, Cancer Lett. 94: 199-205, 1995., Cancer Lett. 99: 59-72, 1996).
- <13> 유럽산의 변종인 한국산 겨우살이(*Viscum album*, L. var. *coloratum*)는 유럽산에 비하여 그 효능이 우수하다고 알려져 있으나 유럽산에 비해서는 연구가 미비한 상태이다 (Park 등 약학회지, 38(4) 418-424, 1994, 약학회지, 39(1) 24-30, 1995., Arch. Pharm. Res.: 20 (4) :

306-312, 1997., Arch. Pharm. Res. : 21(4) 429-435, 1998., Foods and Biotechnology : 8 (4) 232-237, 1999).

4> 본 발명자는 한국산으로부터 효과적으로 렉틴을 분리하였으며, 유럽산 렉틴과 유사한 세포독성효과가 있는 것으로 나타났으며, 렉틴을 제거한 추출물 분획은 활성이 거의 없는 것으로 나타났다(Park 등 Food Sci. and Biotechnol.: 8 391-396, 1999., Foods and Biotechnology : 8 (4) 232-237, 1999). 또한, 한국산 겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum*) 유래의 렉틴 단백질의 유전자 및 그 아미노산 서열을 분석하였으며, 컬럼 크로마토그래피를 하여 렉틴을 순수하게 분리하고 상기 분리한 렉틴 단백질이 생체 면역기능을 증강시키고 세포면역능을 유도하는 항암기능이 있음을 확인하고, 효소결합 렉틴 검출법 (ELLA)을 이용한 겨우살이 렉틴의 정량법을 개발하여 특허를 출원하였다(대한민국 특허 제2000-83383). 또한, 안정성이 있으며, 활성이 강화된 약물을 개발하던 중 겨우살이를 증류수로 추출한 수추출물에 정제된 렉틴을 첨가하여 항암활성을 강화시킨 제제가 부작용이 적고 피부암을 포함한 각종 암과 암의 전이억제에 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한, 아폽토시스에 의한 세포독성, 신생혈관형성억제, 텔로메라제 활성억제에 의하여 항암작용을 하는 렉틴으로 강화된 겨우살이 추출물 및 이를 포함하는 항암제용 조성물을 개발하고, 약제를 피부암, 구강암 등 환부에 직접 투여함으로써 항암효과를 발휘할 수 있는 약물을 개발하여 출원하였다 (대한민국 특허 제2001-0061118).

<15> 그러나, 주된 항암성분이 렉틴임에도 불구하고 현재 생산되고 있는 겨우살이 약물은 여러 성분이 복합적으로 함유되어 있는 수추출물이며, 임상적으로도 복합추출물이 렉틴 단일성분보다 효과가 더 우수한 것으로 알려져 있다. 복합추출물이 주성분인 렉틴 단일 성분보다 효과가 우수한 것은 비스코톡신, 알칼로이드(alkaloid) 등 렉틴 이외에 겨우살이에 함유되어 있는 활성 성분과의 상승효과 때문인 것으로 추측되고 있다. 특히, 분자량이 5 kD 인 비스코톡신도 우수

한 항암효과를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다(Schaller 등, *Phytotherapy Res.* 10, 473-477, 1996). 또한, 복합추출물에 함유되어있는 렉틴이 순수하게 정제된 형태의 단일성분보다 훨씬 안정성이 높은 것도 중요한 요인인 것으로 추측되고 있다.

- 16> 이와 같이 겨우살이는 부작용이 거의 없으면서 우수한 항암효과를 발휘할 수 있다. 따라서 단일 경구투여가 가능하다면 암의 예방 및 치료를 위하여 광범위하게 사용될 수 있을 것이다. 겨우살이 렉틴(ML-1)을 피하주사보다 10배-1000배정도 높은 용량(0.05 mg-3 mg/kg body weight)으로 경구투여 시, 장내에서 파이어소절(Peyer's patch) M-세포와 강력하게 결합하였으며, 암세포의 성장을 억제시키고, TNF- α 및 IL-1 β 등의 사이토킨(cytokine) 분비를 촉진시키는 것으로 보고되었다(Pusztai 등, *J. Nutr. Biochem.* 9; 31-36, 1998). 그러나 렉틴의 파괴를 고려한 고용량의 약물의 투여는 경제적인 문제가 있을 뿐만 아니라, 임상적으로 사용되고 있는 복합추출물을 경구 투여 시 비스코톡신 등, 장에서 파괴되지 않는 다른 물질의 과잉섭취로 인한 부작용이 생길 가능성이 높다. 따라서 겨우살이 제제는 암의 예방 및 치료를 위하여 광범위하게 사용될 수 있음에도 불구하고, 주사제로만 개발되어 있기 때문에 널리 사용되지 못하고 있다.
- 17> 의약품을 개발할 때 가장 많이 선택되는 투여경로는 경구 투여이며, 약물이 약효를 나타내기 위해서는 투여된 약물이 생체 장벽(barrier)을 통과하여 전신 순환혈에 도달해야 한다. 경구로 투여된 제제는 식도를 통과한 후 소화관 내를 통과하면서 분해되고 약물을 방출한다. 사람의 소화관은 전체 길이가 수 미터(meter)나 되기 때문에 이를 통과하는데 상당한 시간이 걸린다. 그 사이에 소화관의 pH는 산성, 중성을 거쳐 약알칼리성으로 바뀌고, 약물은 다양한 소화효소 및 소화관내 내용물과 접촉하게 된다. 이 도중에 약물은 제제로부터 분자상태로 방출되어 소화관 점막(상피세포층)을 거쳐 흡수된다. 소화관에서의 약물은 대부분 위장관의 장간막 혈관(mesentric vein)을 통하여 간으로 가서 초회 통과 효과를 받는다. 따라서 약물이 소화관 내에

서 안정성에 문제가 있거나 점막투과성이 낮기 때문에 경구투여제로 개발하기 어려운 경우가 많다. 특히, 인슐린, 인터페론 등의 단백질 또는 펩타이드, 렉틴 등의 당단백질 성분은 경구 투여 시 소장에서 아미노산, 혹은 작은 펩티드로 소화된다. 소장의 상피세포 내로 들어온 펩타이드는 세포내의 아미노펩티다아제(aminopeptidase)에 의해 신속하게 아미노산으로 분해된 후, 아미노산 수송계에 의해 전신 순환계로 흡수된다. 따라서 이와 같은 성분은 경구 투여 시 효능이 거의 상실되는 것으로 알려져 있다.

- 18> 이런 경우 약물의 위장관내 안정성을 높여 줌으로써 흡수성을 개선할 수 있다. 이를 위하여 우선, 투여 후 최초에 체류하는 위 내에서 위산에 분해되지 않도록 해야 한다. 장에서의 분해 문제를 극복하기 위한 시도로 캡슐화된 물질이 위에서 마주치는 산성 및 펩신 매개 단백질 분해를 피할 수 있도록 여러 가지 장용성 제제가 개발되었다. 장용성 제제(정제, 과립제)는 위의 낮은 pH나 중성 pH에서는 녹지 않다가 장에 도달하면 알칼리성 장액에 의해 비로소 녹는 성질을 갖고 있는 고분자물질로 코팅한 제제로 소장 내에서 선택적으로 약물을 방출하게끔 설계되어 있다. 또한, 장에서의 분해 문제를 극복하기 위한 시도로 단백질 분해효소 저해제(예컨대 aprotinin, soybean trypsin inhibitor, bestatin 등)를 병용하는 방안도 시도되고 있다(Drug Delivery Rev., 4, 171, 1990).
- <19> 일반적으로 조직간극 중에 있는 저분자물질(분자량 5000 이하)은 모세혈관벽을 자유로이 통과할 수 있으므로 대부분 혈관계로 이행하여 소실된다. 이에 비해 고분자 물질이나 미립자, 친유성이 높아 킬로미크론(chylomicron)을 형성하여 크기가 커진 물질은 혈관벽을 투과할 수 없기 때문에 각종 점막을 통과한 후 점막 하 조직에서 림프계를 거쳐 전신으로 운반된다. 장관점막에는 장관세포 이외에 극소수의 파이어소절(Peyer's patch)이 존재하며 여기에는 M(microfold)-세포와 림프조직 등이 존재한다. 그러나 림프의 유량은 혈류량의 1/200 - 1/500

으로 매우 낮기 때문에 소화관에서 림프관으로 잘 흡수되는 약물은 드물다. 비타민 A나 콜레스테롤 등의 지방성 물질, 비타민 B₁₂ 및 그 유도체, 렉틴 함유제제, 리포솜 및 초미세입자(직경이 10 μm 이하) 등 특수한 제형의 약물은 파이어소절(Peyer's patch)에 있는 M-세포를 경유하여 림프계로 이행되어 간을 거치지 않고 직접 순환혈류로 들어간다. 따라서 이런 성질을 가진 물질은 흡수장벽 투과성만 부여해 주면 림프 지향성 운반체로 활용할 수 있다.

- 10> 약물이 만약 림프계로 흡수될 수 있다면 장관림프와 흉관림프를 거쳐(간장을 통하지 않고) 전신순환에 들어가기 때문에 간장에서의 초회 통과를 피할 수 있다. 따라서 렉틴은 장관점막의 림프계의 흡수장벽 투과성을 부여해 주고, 파이어소절(Peyer's patch)에 있는 M-세포를 경유하여 림프계로 이행되어 간을 거치지 않고 직접 순환혈류로 들어갈 수 있으므로 림프 지향성 운반체로 활용될 수 있다. 특히, 림프계는 암의 전이나 세균감염의 확대경로가 되기 때문에 경로의 도중에서 관문의 역할을 하고 있는 림프절에 병소가 형성되기 쉽다. 따라서 이 병소를 치료 또는 진단하기 위해서 항암제, 항균제 등의 화학요법제나 방사선 진단시약을 림프계에 선택적으로 보내야 할 때, 렉틴을 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

- 21> 약물은 적용에 편리하고 약리효과가 최적으로 발현될 수 있는 제형(formulation)으로 가공된 후 여러 경로를 통해 생체에 투여된다. 투여된 약물은 제형으로부터 방출된 후 흡수, 분포, 대사, 배설의 과정을 거치면서 생체 내에서 약리효과를 나타내게 된다. 생체 내에서 약물이 안정적이고 효과적으로 발현되며 의도된 작용부위에 선택적으로 작용될 수 있도록 하기 위해서는 약물의 생체 내

거동을 각종 기술로 제어할 필요가 있다. 이와 같이 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 제형을 약물 전달 시스템(Drug Delivery System; DDS)이라 한다. 방출제어시스템(controlled release system)은 경구 투여를 위한 캡슐형, 매트릭스형, 경구 및 주사용의 마이크로캡슐(microcapsule), 마이크로스피어(microsphere), 마이크로파티클(microparticle), 나노파티클(nano-particle) 그리고 리포솜(liposomes) 또는 이식체(implants) 등의 다양한 형태가 있다(J. Kost. 1995).

22> 마이크로캡슐은 제조된 형태 및 크기에 따라 다양하게 정의된다. 즉, 마이크로캡슐(microcapsule)은 고체 또는 액체약물이 중심핵에 위치한 구형입자를 말하며, 마이크로스피어(microsphere)는 고분자물질 중에 고체 또는 액체약물이 분산되어 있는 것으로 다핵의 마이크로캡슐이라고 할 수 있다. 또한, 마이크로파티클(microparticle)은 마이크로캡슐과 마이크로스피어를 모두 포괄하는 개념으로, 고분자 매트릭스나 지질 등의 미립자를 약물 운반체로 사용하는 미립자성 약물운반체를 의미한다. 이 중 입자경이 $1\mu\text{m}$ 이하의 것을 나노스피어(또는 나노파티클)라 부른다. 이하, 본 명세서에서는 달리 특정하지 않는 한 이 용어들은 상기와 같은 의미로 사용된다.

23> 리포솜(Liposome)은 생체 세포막과 유사한 구조를 가지므로 생체막의 기능, 약물전달 시스템 등에 응용되고 있다. 리포솜은 인지질이라는 생체 구성 성분으로 이루어져 있어 체내에서 분해가 가능하고 세포 독성이 없으며, 친수성 부분과 소수

성 부분이 동시에 존재하여 수용성 약물과 지용성 약물 모두를 포획할 수 있다. 또한, 리포솜 내로 약물을 포획하여 약물의 불활성화를 막을 수 있고, 펩타이드성 약물의 생체 이용률을 높일 수 있으며, 약물을 거의 모든 투여 경로로 투여 할 수 있고, 특정 조직에 표적이 가능하여 약물의 치료 효과를 높일 수도 있다. 리포솜은 형태에 따라 2중막이 여러 겹으로 중첩되어 있는 다막 리포솜 (multilamellar vesicles, MLV)과 단일막으로 구성된 단막 리포솜 (unilamellar vesicles)으로 나눌 수 있고, 단막 리포솜은 크기에 따라 작은 단막 리포솜 (small unilamellar vesicles, SUV)과 큰 단막 리포솜 (large unilamellar vesicles, LUV) 등으로 나눌 수 있다. SUV의 경우 20~50nm 크기를 가지며, LUV는 100~1000nm의 크기를 가진다.

- 24> 고형 지질성 나노입자(solid-lipid nanoparticles; SLN)는 나노형 미세입자형 경구용 약물 시스템으로 지질성 물질들을 활용하여 제조된다. SLN은 고분자성 미세입자나 리포솜 등과 비교할 때 봉입약물의 화학적 안정성을 증가시키고 방출을 제어할 수 있으며 입자들간의 응집이 적다는 특징이 있다.
- 25> 마이크로캡슐화(microcapsulation)란 미세한 고체입자나 용액을 다양한 코팅물질로 둘러싸거나 혹은 혼합된 형태로 크기가 0.1 μ m에서 수백 μ m로 미세하게 가공하는 기술이다. 즉, 마이크로캡슐은 약물, 피막물질, 첨가제 및 용매를 특정방법으로 반응, 혹은 조작하여 형성되는 미세입자를 말한다. 마이크로캡슐화로서 고체, 액체, 또 기체까지도 현미경적 크기의 입자에 봉입할 수 있다.
- 26> 마이크로캡슐의 제조 공정에서 단백질은 과도한 스트레스에 노출된다. 단백질은 분자량이 크고 3차원적 구조로 인해 그 역가(activity)와 물리적인 특성이 크

게 좌우되기 때문에 일반 화학합성 약물에 비해 쉽게 변성이 된다. 따라서 단백질 의약품의 마이크로캡슐 제조공정은 열, 전단 스트레스(shear stress), 극심한 pH 변화, 유기 용매, 동결과 건조에의 과도한 노출을 배제시켜야 한다. 또한, 저장 기간 동안 마이크로캡슐화된 단백질이 수화될 수 있으며 이러한 환경에서 단백질은 더욱 쉽게 변성, 응집(aggregate) 및 불활성화될 수 있다. 따라서 단백질, 혹은 펩타이드를 마이크로캡슐화할 때는 생분해성 중합체로 만들어져야 하며, 공정과정이 단백질, 혹은 펩타이드의 변성을 일으키지 말아야 하고, 마이크로캡슐화 효율(encapsulation efficiency)이 충분히 높아야 한다. 또한, 가급적 제조방법이 간단하고 유기용매의 사용을 최소화하며 제조방법이 산업적으로 대량화가 가능해야 한다.

<27> 마이크로캡슐화 기술은 매우 다양하며, 방법에 따라 코어(core) 물질형태도 다르며 최종적인 입자의 크기도 다르다. 마이크로캡슐화에 사용되는 물질에는 다양한 합성 및 천연고분자가 있으며, 이 중 생체 내에서 분해되는 고분자로는 알부민, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 알지네이트(alginate), 전분, 폴리아미노산 (polyamino acid), 폴리락티드 (polylactides : PLA), 폴리글리콜리드 (polyglycolides : PGA), 폴리 β -히드록시 부틸산(poly β -hydroxy butyric acid; PHB), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리안하이드라이드 (polyanhydrides), 폴리 오르토에스테르 (polyorthoesters) 등과 이러한 물질들의 공중합물인 PLGA 등이 있다. 마이크로캡슐화 방법에는 기중현탁법, 상분리법, 공기분사법, orifice/centrifugal 법, 초임계법 (supercritical fluid technique), 팬코팅법, 용매증발법, 분무건조/응고법, 계면중합법, 용융 냉각법 등이 있다.

<28> 다중 유화 용매 증발법(multiple emulsion solvent evaporation method)은 증류수나 완충용액에 녹인 약물(inner water phase; IWP)과 물과 혼합되지 않고 휘발성이 강한 유기용매에 용해되어 있는 고분자 용액(organic solvent; OS)으로 구성된다. IWP를 유기용매 상에 유화시켜 1

차 유상액(primary emulsion; W/O)을 만든 다음, 이 유상액을 유화제가 포함되어 있는 액상(outer water phase; OWP)에 부으면서 교반하여 2차 유상액(W/O/W)을 만든다. 만들어진 다중 유상액(multiple emulsion)을 계속적으로 교반하여 유기용매를 증발시켜 고분자의 침전을 유발 시킴으로써 고체의 약물 보유 마이크로파티클(drug-loaded microparticle)을 형성한다. OWP에 유화제의 존재는 구형의 마이크로파티클의 형성에 중요한 역할을 한다. 유화제는 유기 용매의 제거 동안 미세 입자들의 엉김(coagulation)을 방지하는 역할을 한다. 유화제로는 일반적으로 폴리비닐알코올(poly(vinylalcohol); PVA)을 사용하나 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 알기네이트(alginates), 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 젤라틴(gelatine) 등도 사용될 수 있다. 유기 용매의 제거는 정상 기압 하에서 또는 감압 상태에서 할 수 있다.

- 29> 의약품을 개발할 때 가장 많이 선택되는 투여경로는 경구 투여이다. 그러나 약물이 소화관내에서 안정성에 문제가 있거나 점막투과성이 낮기 때문에 경구투여제로 개발하기 어려운 경우가 많다. 예를 들면, 인슐린, 인터페론 등의 단백질 또는 펩타이드, 렉틴 등의 당단백질 성분은 경구 투여 시 소장에서 아미노산, 혹은 작은 펩티드로 소화된다. 즉, 경구로 투여된 제제는 식도를 통과한 후 소화관을 통과하면서 분해되고 약물을 방출한다. 그 사이에 소화관의 pH는 산성, 중성을 거쳐 약알칼리성으로 바뀌고, 약물은 다양한 소화효소 및 소화관내 내용물과 접촉하게 된다. 소장의 상피세포 내로 들어온 펩타이드는 세포내의 아미노펩티다아제(aminopeptidase)에 의해 신속하게 아미노산으로 분해된 후, 아미노산 수송계에 의해 전신 순환계로 흡수된다. 따라서 단백질 성분은 경구 투여 시 소장에서 신속하게 아미노산으로 분해된 후, 전신 순환계로 흡수되기 때문에 효능이 거의 상실된다.

- 0> 따라서 렉틴 단백질이 주성분인 각종 천연물질을 경구로 투여할 수 있다면 질병치료를 위하여 광범위하게 사용될 수 있음에도 불구하고, 널리 사용되지 못하고 있는 실정이다. 이런 경우 약물의 위장관내 안정성을 높여 줌으로써 흡수성을 개선할 수 있다. 이를 위하여 우선, 투여 후 최초로 체류하는 위 내에서 위산에 분해되지 않도록 해야 한다. 장에서의 분해 문제를 극복하기 위한 시도로 캡슐화된 물질이 위에서 마주치는 산성 및 펩신 매개 단백질 분해를 피할 수 있도록 여러 가지 장용성 제제가 개발되었다. 장용성 제제(정제, 과립제)는 위의 낮은 pH나 중성 pH에서는 녹지 않다가 장에 도달하면 알칼리성 장액에 의해 비로소 녹는 성질을 갖고 있는 고분자물질로 코팅한 제제로 소장 내에서 선택적으로 약물을 방출하게끔 설계되어 있다. 장용성 코팅(enteric coating)은 압축정의외에도 약물입자, 과립 등에도 적용될 수 있으며 피복의 두께도 다양하게 할 수 있다. 장용성 코팅제는 셀락(shellac), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트 (hydroxypropylmethyl
- 31> cellulose phthalate), 폴리비닐아세테이트 프탈레이트 (polyvinylacetate phthalate), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 (cellulose acetate phthalate), 제인(Zein), 유드래지트 (Eudragit) L100, S100, 알지네이트(alginate), 젤라틴(gelatin), 전분(starch) 등, 장에서 녹는 특수한 피막물질을 한 가지 또는 두 가지 이상을 복합하여 코팅한다. 제제에 코팅하는 방법은 다양하며 팬코팅기나 유동층 코팅기를 사용하며, 또는 분무/분사하여 막을 입히거나 정전기를 이용한 분말코팅기술, 건조(dry) 코팅, 핫-멜트(hot-melt) 코팅 등을 한 가지 또는 두 가지 이상을 복합하여 이용한다.
- <32> 따라서 본 발명은 위장관 내 환경에서 불안정하여 경구 투여하기 어려운 겨우살이 및 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여 정제 또는 과립화하고, 제조된 정제 또는 과립을 저온에서 코팅기제와 가소제를 사용하여 코팅함으로써 장용성 제제를 제조하는 방법을 제공한다. 또한

렉틴이 포함된 마이크로캡슐을 제조한 후 장용성 이중 마이크로캡슐을 제조하는 방법을 제공한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 3> 본 발명의 기술적 과제는 본 발명은 겨우살이를 비롯한 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여, 장용성 코팅제제를 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공하고, 또한 렉틴을 주성분으로 하여, 장용성 마이크로캡슐을 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공함으로써 달성하였다.

【발명의 구성 및 작용】

- 34> 본 발명은 겨우살이를 비롯한 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여, 장용성 코팅제제를 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공한다.
- 35> 또한 본 발명은 렉틴을 주성분으로 하여, 장용성 마이크로캡슐을 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공한다.
- 36> 본 발명은 부형제로서 만니톨 115g, 아비셀(Avicel)PH 101 18g, 칼슘-포스페이트 디베이직 17g을, 결합액으로 하이드록시프로필메틸셀룰로스 20g, 물 100ml, 에탄올 100ml를, 코팅액으로 제인-디피 25g, 셀락 35g, 80% 에탄올 180ml를 포함하는 것을 특징으로 하는, 렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물에 관한 것이다.
- 37> 또한 본 발명은 PLGA/CH₂Cl₂ 4ml, 1% 폴리비닐알콜 50ml, 계면활성제 Span80 2ml, 식용유 48ml, 1~4% 소듐 알지네이트 용액 8ml 및 0.02~0.2M CaCl₂ 용액 60ml를 포함하는 것을 특징으로 하는 렉틴의 마이크로캡슐 제조용 조성물에 관한 것이다.
- 38> 겨우살이 및 렉틴이 함유된 천연물의 건조분말, 수추출물 분말, 압축정, 과립 등에 대하여 장용성 코팅을 실시하였는데, 이때 장용성 코팅제는 셀락 (shellac), 하이드록시프로필메틸셀룰

로오스 프탈레이트 (HPMCP, Pharmacoat 606, Pharmacoat 645), 폴리비닐아세테이트 프탈레이트 (polyvinylacetate phthalate), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 (cellulose acetate phthalate), 제인(Zein), 유드래지트(Eudragit) L100, 유드래지트 S100, 알지네이트 (alginate), 젤라틴 (gelatin), 전분(starch) 등, 장에서 녹는 특수한 피막물질을 한 가지 또는 두 가지 이상을 복합하여 코팅할 수 있다. 코팅하는 방법은 다양하며 팬코팅기나 유동층 코팅기를 사용하며, 또는 분무/분사하여 막을 입히거나 정전기를 이용한 분말코팅기술, 건조 (dry) 코팅, 핫-멜트(hot-melt) 코팅 등을 한 가지 또는 두 가지 이상을 복합하여 사용할 수 있다.

- 39> 본 발명에서 겨우살이 및 렉틴이 함유된 천연물의 함량은 전체 코팅과립의 1 내지 95 중량%가 바람직하다. 본 발명에서 코팅액은 적당한 용매에 코팅기제 및 가소제를 용해시켜 제조된다. 코팅에 사용되는 코팅기제로는 메타크릴산-아크릴산에틸공중합체류(유드래지트 (Eudragit, 등록상표) E-100, 유드래지트 L 30D; 롬 앤드 하스(Rohm & Hass)사, 독일), 옥수수 단백추출물(제인-디피(Zein-DP, 등록상표)) 및 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 알긴산나트륨, 알긴산, 셀락류, 카보폴류(카보머(등록상표), 카복시비닐폴리머), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈프탈레이트류, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 아세테이트숙시네이트, 하이드록시프로필메틸 아세테이트숙시네이트, 카복시메틸셀룰로즈, 셀룰로즈아세테이트프탈레이트류, 하이드록시프로필셀룰로즈류, 에틸셀룰로즈류, 메틸셀룰로즈류, 폴리비닐아세테이트프탈레이트, 대두단백, 소맥단백, 대두단백 또는 소맥단백의 가공물질, 키틴, 키틴산, 키틴 또는 키틴산의 가공물질, 한천, 카라기난(Carrageenan), 펙틴(Pectin), 구아 검(Guar gum), 로우커스트 빈 검(Locust bean gum), 크산탄 검(Xanthan gum), 젤란 검(Gellan gum), 아라비아 검(Arabic gum), 콜리코트 (Kollicoat) MAE 30 DP(BASF社), 탄소수 6 내지 12의 중쇄 지방산류 중 선택된 어느 하나 또는

둘 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 코팅액 제조를 위한 코팅기제의 사용량은 전체 코팅과립에 대하여 1 내지 50 중량%가 바람직하다.

- 40> 본 발명 방출제어형 코팅과립의 코팅에서 사용되는 가소제는 폴리에틸렌글리콜류, 글리세린지방산에스테르류, 소르비탄 지방산 에스테르류, 프로필렌글리콜, 글리세린, 구연산트리에틸, 트리아세틴, 세틸알콜, 스테아릴알콜 중 선택된 어느 하나 또는 둘 이상 혼합하여 사용할 수 있으며, 가소제의 사용량은 전체 코팅과립에 대하여 0.5 내지 50 중량%가 바람직하다. 상기 코팅기제 및 가소제의 사용량 범위를 벗어난 경우, 코팅과립의 봉해가 늦어져 신속한 약효발현을 기대할 수 없거나 안정한 코팅막을 얻을 수 없게 된다.
- 41> 본 코팅에 사용된 용매로는 물, 에탄올, 알콜(메탄올, 이소프로필알콜), 아세톤, 아세토니트릴, 메틸렌클로라이드, 에테르, 헥산, 클로로포름, 1,4-디옥산, 테트라하이드로푸란, 디메틸설폭사이드, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트 중 선택된 어느 하나 또는 둘 이상 혼합하여 사용할 수 있다.
- 42> 본 발명에 사용되는 부형제로는 전분, 유당, 미결정셀룰로즈류, 경질무수규산, 칼슘 포스페이트 디베이직, Ac-di-sol(), PVP(polyvinylpyrrolidon) K-30 등이 있고, 사용량은 전체 코팅과립의 0.5 내지 90 중량%가 바람직하다.
- 43> 과립의 제조에는 유동층 조립기, 하이스피드 믹서, 원통형 과립기를 사용한다.
- 44> 코팅에 사용된 장치는 일명 "유동층조립기(Fluid bed coater)" 또는 CF-과립기, 또는 이와 유사한 장치로서 본 발명에서는 유동층 조립기 Granulex-40(일본의 프레운드 캄파니(Freund Co.))를 사용하고, 이와 유사한 장치로도 상기 제제에 대한 제조가 가능하다.

- 5> 본 발명 장용성 코팅과립의 제조를 위한 장치의 온도조건은 유입공기의 온도는 35~70℃의 범위이다. 또한, 모든 공정의 장치 내 과립 온도는 25~60℃를 유지하는 것이 바람직하다. 왜냐하면, 단계별 장치 내 과립이나 원료혼합물의 온도는 25℃ 이하에서는 흡습된 과립끼리의 응집을 방지할 수 없고, 60℃ 이상의 온도에서는 공정 중 투입전의 과립 또는 장치 내 형성중인 과립이 부서질 가능성이 있기 때문이다. 이때, 온도는 계절에 따라 상온이 달라지므로 이에 맞추어 조정되는데, 예컨대 장마철이나 겨울에는 상기 온도범위 중에서 다소 높은 온도가 코팅하기에 적합하고, 여름에는 상기 온도범위 중 낮은 온도에서도 코팅이 가능하다.
- 46> 한편, 본 발명의 렉틴 단백질의 마이크로캡슐화(microencapsulation) 방법은, 이중 유상액 방법(double emulsion method)을 이용한다. 고분자 물질로는, 생체에서 분해되는 고분자 물질이 사용된다. 예를 들어, 알부민, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐; 폴리락티드(poly lactides : PLA) 및 폴리글리콜리드(polyglycolides: PGA)와 같은 히드록시 산; 폴리락티드 코 글리콜리드(poly(lactide-co-glycolides: PLGA), PEG, 폴리 β-히드록시 부틸산 (poly β-hydroxy butyric acid; PHB), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리언하이드라이드 (polyanhydrides), 폴리오르토에스테르 (polyorthoesters), 폴리락티드 코 글리콜리드 (poly(lactide-co-glycolides : PLGA), 폴리언하이드라이드, 폴리우레탄, 폴리(부틸산), 폴리(발레릴 산) 및 폴리(락티드-코-카프로락톤) 등과 그 유도체, 그리고 이들의 공중합체 및 혼합물이 사용될 수 있다. 여기서 사용되는 "유도체"라는 용어는 화학기, 예를 들어 알킬, 알킬렌의 치환, 부가, 수산화, 산화 및 당업자에 의해 통상적으로 행해질 수 있는 다른 변형을 갖는 고분자를 포함한다. 일반적으로, 생분해성 고분자 물질들은 비효소적 및 효소적 가수분해 모두에 의해, 그리고 표면 또는 벌크 침식에 의해 생체 내에서 분해된다.

- 7> 이중유상-유기용매증발 공정(double-emulsification solvent evaporation procedure)을 이용하여 렉틴을 마이크로캡슐화(microencapsulation)하는 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- 18> 렉틴 용액을 고분자 용액 (예를 들어, PLGA/DCM 용액)에 첨가하여 1차 유상액을 만들고, 이것을 유화제(예를 들어, 1% PVA 용액)에 천천히 첨가하여 2차 유상액을 만든다. 이후 교반하여 고분자를 응고시킨 후 원심 분리로 입자를 회수하고, 증류수로 3회 세척하여 마이크로캡슐을 얻는다.
- 49> 상기 렉틴 방출제어제제는 약제학적으로 허용가능한 부형제나 운반체 또는 보조제를 부가적으로 포함할 수 있다.
- 50> 상기 렉틴 방출제어제제는 폐를 통한 흡입투여제; 경구투여형 제제; 주사제; 경피흡수제 등의 여러 형태로 제조될 수 있다. 또한, 기존에 알려진 제형화 기술에 따라, 본 발명의 마이크로캡슐(예를 들어, crystal/PLGA)을 이용한 렉틴의 방출제어제제를 제조할 수 있다.
- 51> 또한, 역상 증발(reverse-phase evaporation, REV) 방법, 즉, 에테르(ether)에 용해시킨 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 등의 인지질 용액과 완충용액에 용해시킨 렉틴 용액을 초음파 처리한 후 에테르를 증발시켜 리포솜을 제조할 수 있다.
- 52> 또한, 렉틴이 포함된 장용성 이중 마이크로캡슐은 상기에서 제조한 마이크로캡슐, 혹은 리포솜을 위액에서 안정하고 장액에서는 팽창, 붕괴되는 알긴산염으로 코팅하여 제조할 수 있다.
- 53> 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 다음의 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의

해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능한 것은 물론이다.

4> 또한, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예와 실험예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니다.

55> 실시예 1 : 렉틴함유 천연물의 분말, 수추출물 및 수추출물 분말, 렉틴의 제조

56> 겨우살이, 산수유, 달맞이꽃, 강낭콩, 완두콩, 맥문동, 목단, 상륙, 모과, 작약, 파리, 토당귀, 담쟁이, 명아주, 팔투근, 표고버섯, 반하, 회양목, 아카시아 등 각종 식물과 별불가사리, 백합조개, 미꾸라지 등의 각종 해양천연물의 분말, 수추출물 및 수추출물 분말 및 렉틴은 유사한 방법으로 제조할 수 있으며, 본 발명에서는 겨우살이를 예를 들어 설명한다.

57> 겨우살이의 새순 세 마디의 잎, 열매 및 줄기를 분류하여 세절한 후 증류수로 세척한 다음 동결 건조시키거나 혹은 35℃ 이하의 저온에서 통풍시키며 건조시켰다. 분말은 롤 분쇄기(roll crusher), 볼 밀(ball mill) 등 각종 제분기나 분쇄기 등을 사용하여 35℃ 이하의 저온을 유지하며 제조하였다. 또한, 신선한 겨우살이를 액체질소로 냉동시켜 동일한 방법으로 분쇄시켜 제조하였다. 입자의 크기는 필요에 따라 다양하게 조절하였다. 건조분말 1mg에는 92 ng의 렉틴(VCA)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

58> 본 발명자에 의해 개발된 추출방법(대한민국 특허 제2000-83383 및 제2001-0061118)에 따라 겨우살이로부터 추출물을 제조하였다. 각각의 겨우살이 새순 세 마디의 잎, 열매 및 줄기를 분류하여 세절한 후 증류수로 세척한 후에 -70℃ 에서 보관하였다. 증류수를 시료중량에 대하여 10 배로 첨가하면서 저속분쇄기로 갈고, 4℃ 에서 24시간 동안 교반하였다. 거즈로 걸러낸 후

12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 공극 크기를 달리 하는 막여과기(membrane filter)에 의해 순차적으로 여과(20 μm , 0.45 μm 및 0.22 μm)하여 균을 제거한 후에 최종농도가 100 mg/ml 가 되도록 멸균된 인산염 완충액(PBS)으로 조절하여 원액으로 사용하였다. 이 때 농도의 표시 100 mg/ml 는 신선한 겨우살이 100 mg으로 추출한 용액 1 ml를 뜻한다. 그리고, 효소결합 렉틴 검출법 (ELLA)을 이용하여 겨우살이 수추출물 중의 렉틴을 정량한 결과, 1 mg/ml 농도의 VCE 1 ml에는 30 ng의 렉틴(VCA)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 또한, 막여과기(membrane filter)에 의해 순차적으로 여과(20 μm , 0.45 μm 및 0.22 μm)한 액을 동결건조시켜 갈색의 분말을 얻었다.

- 59> 본 발명자에 의해 개발된 정제방법(대한민국 특허 제2000-83383 및 제2001-0061118)에 따라 아시알로페투인-세파로스 (asialofetuin-Sepharose) 4B를 이용하여 한국산 겨우살이 (*Viscum album* L. var. *coloratum*) 렉틴(VCA)을 추출, 정제하였으며, 렉틴의 농도는 BCA 방법을 이용한 단백질 측정법을 이용하였으며, 렉틴활성은 혈구응집반응을 이용하여 확인하였다.

<60> 실시예 2 : 과립공정

<61> < 실시예 2-1 >

- <62> 렉틴이 함유된 천연물의 수추출물 및 렉틴 용액이 포함된 코팅용 씨드 과립은 셀룰로스, 전분, 설탕, 젤라틴을 30:30:30:10의 비율로 혼합한 후, 상기에서 제조한 겨우살이 수추출물 용액 혹은 렉틴용액을 가하여 믹서(Waring blender)로 잘 혼합하여 제조하였다. 젖은 덩어리를 4℃ 진공에서 건조시키고, 적절한 크기의 미립자가 형성되도록 분쇄한 후 적절한 크기의 체로 쳐서 4℃ 진공에서 보관하였다.

3> < 실시예 2-2 >

4> 실시예 1에서 제조한 렉틴이 함유된 천연물의 분말 또는 수추출물 엑기스 분말 150 g과 부형제로 만니톨 115g, 아비셀(Avicel)PH 101, 18g, 칼슘-포스페이트 디베이직 17g을 혼합하여 유동층 조립기에서 부유시키면서 결합액(하이드록시프로필메틸셀룰로스 20g, 물 100 ml, 에탄올 100 ml)을 분사시켜 코팅용 씨드 과립을 제조하였다. 씨드과립 제조용 부형제는 만니톨+전분+유당+물, 또는 포도당+PV K-30+아비셀+물, 또는, 유당+만니톨+Ac-di-sol+하이드록시프로필셀룰로스+70% 에탄올, 또는 전분+유당+알긴산나트륨+물, 또는 만니톨+백당 등을 적절한 비율로 혼합하여 사용할 수 있다. 장치 내의 겨우살이와 부형제의 온도는 25~50℃의 범위를 벗어나지 않게 하였다. 유입공기와 배기온도는 35~70℃, 로터(rotor)의 회전수는 100~350rpm의 범위 내에서 공정을 진행하였다.

65> 실시예 3 : 장용성 코팅 공정

66> < 실시예 3-1 > 장용성 과립 코팅 공정

67> 실시예 2의 과립공정에서 제조된 과립을 씨드로서 유동층 조립기에서 부유시키면서 코팅액(제인-디피, 25g, 셀락, 35g, 80% 에탄올 180 ml)을 분사시켜 코팅하였다. 유동층 조립기의 장치 내 생성물의 온도는 25~60℃의 범위를 벗어나지 않게 하였다. 유입공기와 배기 온도는 35~70℃, 로터(rotor)의 회전수는 100 rpm~350 rpm범위 내에서 공정을 진행하였다.

68> 코팅기제로서 옥수수 단백추출물(제인-디피(Zein-DP, 등록상표)) 및 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 대두단백, 소맥단백, 대두단백 또는 소맥단백의 유도체 및 그 가공물질, 메타크릴산

-아크릴산에틸공중합체류(polymethacrylic acid copolymer류; 유드래지트 (Eudragit, 등록상표) E-100, 유드래지트 L 30D, RS30D, 롬 앤드 하스(Rohm & Hass)사, 독일), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈프탈레이트 (HPMCP), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 아세테이트숙시네이트(HPMCAP), 하이드록시프로필메틸 아세테이트숙시네이트 (HPMCAS), 셀룰로즈아세테이트프탈레이트류 (CAP), 폴리비닐아세테이트프탈레이트, 알긴산염류, 셀락류, 카보폴류(카보머(등록상표), 카복시비닐폴리머), 카복시메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈류, 에틸셀룰로즈류, 메틸셀룰로즈류, 키틴, 키틴산, 키틴 또는 키틴산의 가공물질, 한천, 카라기난(Carrageenan), 펙틴(Pectin), 구아 검(Guar gum), 로우커스트 빈 검(Locust bean gum), 크산탄 검(Xanthan gum), 젤란 검(Gellan gum), 아라비아 검(Arabic gum), 콜리코트 (Kollicoat) MAE 30 DP(BASF社), 탄소수 6 내지 12의 중쇄 지방산류 중 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 코팅액 제조를 위한 코팅기제의 사용량은 전체 코팅과립에 대하여 1 내지 50 중량%가 바람직하다.

<69> 위에 명시한 조성 중의 하나로 1차로 코팅된 과립을 다른 코팅액 조성으로 다시 코팅하여 이중 코팅과립을 제조하였다.

<70> < 실시예 3-2 > 장용성 정제 코팅 공정

<71> 식물 건조분말 혹은 추출분말 및 렉틴건조분말과 부형제 분말을 48 메쉬(mesh) 체로 통과시켜 적절한 비율이 되도록 칭량하고 1정당 활택제로서 마그네슘 스테아레이트 5 mg을 가해 균등히 혼합한 후 정제기로 압축하여 정제를 제조하였다. 부형제로는 건식법의 직타제조가 용이한 여러 가지 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC) 유도체와 EC 및 MC 등을 사용하였다.

- 2> 코팅기제로서 옥수수 단백추출물(제인-디피(Zein-DP, 등록상표)) 및 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 대두단백, 소맥단백, 대두단백 또는 소맥단백의 유도체 및 그 가공물질, 메타크릴산-아크릴산에틸공중합체류(polymethacrylic acid copolymer류; 유드래지트 (Eudragit, 등록상표) E-100, 유드래지트 L 30D, RS30D, 롬 앤드 하스(Rohm & Hass사, 독일), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈프탈레이트 (HPMCP), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 아세테이트숙시네이트(HPMCAP), 하이드록시프로필메틸 아세테이트숙시네이트(HPMCAS), 셀룰로즈아세테이트프탈레이트류 (CAP), 폴리비닐아세테이트프탈레이트, 알긴산염류, 셀락류, 카보폴류(카보머(등록상표), 카복시비닐 폴리머), 카복시메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈류, 에틸셀룰로즈류, 메틸셀룰로즈류, 키틴, 키틴산, 키틴 또는 키틴산의 가공물질, 한천, 카라기난(Carrageenan), 펙틴(Pectin), 구아검(Guar gum), 로우커스트 빈 검(Locust bean gum), 크산탄 검(Xanthan gum), 젤란 검(Gellan gum), 아라비아 검(Arabic gum), 콜리코트(Kollicoat) MAE 30 DP(BASF社), 탄소수 6 내지 12의 중쇄 지방산류 중 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 코팅액 제조를 위한 코팅기제의 사용량은 전체 코팅정제에 대하여 1 내지 50 중량%가 바람직하다.

<73> 실시예 4 : 렉틴이 포함된 장용성 이중 마이크로캡슐의 제조

<74> < 실시예 4-1 > 이중유상-유기용매증발 공정을 이용한 마이크로캡슐화

- <75> 0.1N 초산 용액에 용해시킨 렉틴 용액을 유리 시험관에 준비한 4ml PLGA/CH₂Cl₂ 용액에 부어 주고 조직 파쇄기를 사용하여 유상액을 50ml의 폴리비닐알콜 (polyvinyl alcohol) (1%) 용액에 점차적으로 부어 주며 이중 유상액을 만들었다. 3시간 동안 교반하여 이중 유상액의 CH₂Cl₂

를 제거한 후, 2,300rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 증류수로 3번 세척하여 마이크로캡슐을 얻었다.

6> < 실시예 4-2 > 리포솜(LUV)의 제조

7> 포스파티딜 콜린(Phosphatidyl choline, PC)/디에틸 에테르(diethyl ether) 용액 1ml에 적절한 농도의 렉틴 용액 3 ml를 첨가하고, 초음파기로 저온에서 혼합물이 1상(one phase)이 될 때까지 균질화 하였다. 질소기체를 통과시켜 유기용매(diethyl ether)를 완전히 제거하였으며, 리포솜에 봉입되지 않은 물질은 세파덱스 G-25 컬럼을 통과시켜 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 리포솜 침전물을 인산완충용액 2 ml로 희석한 후 트리톤(Triton) X-100을 처리하여 리포솜을 파괴한 후, 렉틴 양을 측정한 결과 68%의 포획효율이 있었다.

78> < 실시예 4-3 > 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 제조

79> 계면활성제 스판(Span) 80 2ml와 식용유 48ml를 5분간 혼합하고, 소듐 알지네이트(sodium alginate) 용액 (1~4 %) 8ml와 실시예 4-1에서 얻은 마이크로캡슐 혹은 실시예 4-2에서 얻은 리포솜을 0.15M NaCl 용액에 희석한 것과 잘 혼합하였다. 두층이 에멀전화 되었을 때 CaCl₂ 용액 (0.02~0.2 M)을 부드럽게 교반하면서 물/오일(water/oil) 에멀전이 깨어질 때까지 60ml씩 빨리 첨가하고, 30분간 교반하며 방치하였다. 알긴산염 나트륨 이중 마이크로캡슐이 형성되면 원심분리 하여 상등액을 제거하고, 침전된 마이크로캡슐은 물, 아세톤, 물로 반복하여 세척한 후 실온에서 건조하였다. 건조한 알긴산염 이중 마이크로캡슐 0.05g을 인산완충액(pH 7.4) 10

ml에 넣고, 37℃에서 교반 후, 여과한 여액의 렉틴의 양을 측정한 결과 59%의 포획효율이 있었다.

0> 실험예 1 : 겨우살이 장용성 코팅과립의 입도분포

1> 실시예 2의 과립공정 중, 렉틴이 함유된 겨우살이 분말 또는 수추출물 액기스 분말 150g과 부형제로 만니톨 115g, 아비셀(Avicel)PH 101, 18g, 칼슘-포스페이트 디베이직 17g을 혼합하여 결합액(하이드록시프로필메칠셀룰로스 20g, 물 100 ml, 에탄올 100 ml)을 분사시켜 제조된 과립을 씨드로서 유동층 조립기에서 부유시키면서 코팅액 1(제인-디피, 25g, 셀락, 35g, 80% 에탄올 180 ml)을 분사시켜 제조한 코팅과립 1의 입도분포를 측정하였다. 또한, 1차로 코팅된 과립을 코팅액 2(유드래지트 L30 165 ml, 물 30 ml, 구연산트리에틸 5g)로 다시 코팅하여 제조한 이중 코팅과립 2의 입도분포를 측정하였으며, 30 내지 40메시의 코팅과립이 80% 이상 분포하는 균질한 코팅과립을 얻을 수 있었다 (표 1).

82> 【표 1】

겨우살이 장용성 코팅과립의 입도분포(%)

각 실시예의 입도 분포(%)	메시크기(mm)			
	20(0.84)	30(0.59)	40(0.42)	50(0.30)
1의 입도분포	7.2	52.5	36.2	4.1
2의 입도분포	15.2	60.3	20.6	3.9

<83> 실험예 2 : 장용성 코팅과립 및 장용성 코팅정제의 인공위액 및 인공장액, 물에서의 용출률

4> 실험예 1에서 사용한 장용성 코팅과립 1 및 2, 그리고 실시예 3-2에서 제조한 겨우살이 장용성 코팅정제의 인공위액, 인공장액, 물에서의 용출률을 측정하였다. 각 용출 매질에서 렉틴의 방출율이 30% 이상에 도달하는 시간으로 계산하였다. 초기 15분마다 1시간동안 샘플을 취하고 이후는 매 30분마다 샘플을 취하여 분석하였으며, 대한약전 제 7개정 용출시험법 제1법인 회전 검체통법을 이용하였다. 즉, 코팅과립 1 및 2를 1g씩 인공위액 (pH 1.2, NaCl-HCl 완충용액)과 인공장액 (pH 6.8, 인산완충용액) 100 ml에 각각 넣고, 37℃에서 100 rpm으로 교반하면서, 시간별로 시료를 취하여 필터(millipore) 여과막을 통과시켜 나온 액의 렉틴 농도를 BCA 방법을 이용하여 측정하였다. 물에서의 용출률은 교반하지 않고 상온에서 일정시간 방치시킨 후 시료를 채취하여 측정하였다. 용출시험결과는 표 2에 나타내었다. 장용성 코팅과립 1, 2의 경우 인공위액에서 3시간동안 전혀 유출되지 않았으며, 인공장액에서는 30분 이내에 전체가 유출되었다. 장용성 코팅과립 1, 2의 경우 물에서는 50% 이상 방출되는데 각각 1주일 이상이 소요되었다. 따라서 코팅과립을 시럽, 액제, 음료, 우유, 요구르트 등에 적용이 가능함을 알 수 있었다. 장용성 코팅정제의 경우 인공위액에서 50% 이상 방출되는데 5.5 시간이 소요되었으며 인공장액에서는 1시간이 소요되었다.

<85> 실험예 3 : 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 표면구조 및 입자분포도

<86> 실시예 4-3에서 제조한 겨우살이 렉틴이 함유된 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 크기를 라이트 스캐터링(Light scattering) 입자 분석기를 이용하여 측정한 결과, 평균입자크기는 염화칼슘 및 알긴산나트륨의 농도가 낮을수록 작았다 (표 2).

7> 4% 알긴산나트륨 용액과 0.2M CaCl_2 용액으로 만들어진 알긴산염 이중 마이크로캡슐을 실온에서 완전히 건조하여, 스캐닝(scanning) 전자현미경 (SEM)을 사용하여 표면구조를 측정한 결과 마이크로캡슐 입자는 구형으로 보였다 (그림 1).

8> 【표 2】

겨우살이 렉틴이 함유된 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 입자크기

CaCl_2 (M)	Sodium alginate (%)	입자크기(μm)
0.2	4	74.17
0.02	4	47.25
0.02	4	17.39

89> 실험예 4 : 알긴산염 이중 마이크로캡슐로부터 렉틴의 용출

90> 실시예 4-3에서 제조한 겨우살이 렉틴이 함유된 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 인공위액, 인공장액에서의 용출률을 측정하였다. 매 30분마다 샘플을 취하여 분석하였으며, 대한약전 제 7 개정 용출시험법 제1법인 회전검체통법을 이용하였다. 즉, 알긴산염 이중 마이크로캡슐 1g씩 프로테아제와 리파제를 일정량 가한 인공위액 (pH 1.4, NaCl-HCl 완충용액)과 인공장액 (pH 7.4, 인산완충용액) 100 ml에 각각 넣고, 37℃에서 50rpm으로 교반하면서, 시간별로 시료를 취하여 필터(millipore) 여과막을 통과시켜 나온 여액 (liposome)은 트리톤(Triton) X-100을 처리하여 파괴한 후 렉틴의 농도를 BCA 방법을 이용하여 측정하였다. 인공위액에서 6시간 경과 후 알긴산염 이중 마이크로캡슐로부터 렉틴의 방출률은 31%이었으며, 인공장액에서 6시간 경과 후 렉틴의 방출률은 85%이었다.

91> 실험예 5 : *In vitro*에서 각종 암세포주에 대한 장용성 코팅제제의 항암활성

- 2> 실험예 2의 인공장액에서 6시간 처리한 겨우살이 장용성 코팅과립으로부터 용출된 액과 실험예 4의 인공장액에서 6시간 처리한 알긴산염 이중 마이크로캡슐로부터 용출된 액의 각종 암세포에 대한 항암활성을 측정하기 위하여 MTT분석을 실시하였다(표 3). 시료의 농도는 코팅과립의 경우에는 과립제조 시 사용된 신선한 겨우살이의 중량으로 환산하였으며, 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 경우에는 리포솜 제조 시 사용된 렉틴의 양으로 환산하였다. 암세포 일정량을 96 웰 플레이트(well plate)에 넣고 다양한 농도의 시료를 첨가하고 48시간 후에 MTT법에 의한 세포의 성장을 조사하여 각 종양세포주의 성장을 50% 억제한 시료의 농도인 IC₅₀ (inhibitory concentration)값으로 나타내었다.
- 93> 실험결과, 표 4에 나타난 바와 같이 장용성 코팅과립의 경우, 코팅 전보다 IC₅₀의 농도가 높은 것으로 보아 제조과정 및 용출과정에서 약간의 활성손실이 있는 것으로 판단되나, 구강암, 인두암, 자궁경부암, 위암, 간암, 유방암, 혈액암 등에는 유의할만한 항암효과가 있는 것으로 나타났다. 또한, 알긴산염 이중 마이크로캡슐의 경우에도 유사하게 마이크로캡슐화 이전보다 IC₅₀의 농도가 높은 것으로 보아 제조과정 및 용출과정에서 약간의 활성손실이 있는 것으로 판단되나, 상당히 강력한 항암활성을 발휘하는 것으로 나타났다.

4> 【표 3】

시료에 의한 각종 암세포주에 대한 세포독성 활성도(IC₅₀)

암세포주 / 시료		장용성 코팅과립 (μg/ml)		알긴산염 마이크로캡슐 (ng/ml)	
		코팅 전(A)	코팅 후(B)	렉틴(C)	마이크로캡슐화(D)
피부암	B16-BL6	120	155	30	45
구강암	A253	5	7	3	7
	KB	5	14	4	10
인두암	Fadu	10	15	2	5
자궁경부암	SNU17	5	9	7	28
	SNU778	23	29	8	15
방광암	T24	150	198	10	18
	J82	80	123	8	15
간암	SK-Hep-1	120	156	8	12
	Hep-3B	14	23	5	18
위암	SNU-1	20	34	7	22
유방암	Hs 578T	10	15	7	13
혈액암	HL-60	7	12	3	10

A: 추출액 1ml를 제조하는데 사용된 겨우살이 분말의 중량(μg/ml)

B: 장용성 코팅과립을 인공장액에서 6시간동안 처리하여 얻은 용출액 1ml를 제조하는데 사용된 겨우살이 분말의 중량(μg/ml)

C: 겨우살이 렉틴의 농도(ng/ml)

D: 겨우살이 렉틴으로 제조한 알긴산염 이중 마이크로캡슐을 인공장액에서 6시간동안 처리하여 얻은 용출액 1ml를 제조하는데 사용된 겨우살이 렉틴의 중량(ng/ml)

【발명의 효과】

- 95> 본 발명은 겨우살이를 비롯한 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여, 장용성 코팅제제를 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공하며, 또한 렉틴을 주성분으로 하여, 장용성 마이크로캡슐을 제조할 수 있는 효과적인 조성물을 제공하는데, 위장관 내 환경에서 불안정하여 경구 투여하기 어려운 겨우살이 및 렉틴이 함유된 천연물을 주성분으로 하여 장용성 제제를 제조함으로써, 약효성분의 생체이용률을 높이고 치료효과를 높일 수 있으므로 이는 의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

부형제로서 만니톨 115g, 아비셀(Avicel)PH 101 18g, 칼슘-포스페이트 디베이직 17g을, 결합액으로 하이드록시프로필메틸셀룰로스 20g, 물 100ml, 에탄올 100ml를, 코팅액으로 제인-디피 25g, 셀락 35g, 80% 에탄올 180ml를 포함하는 것을 특징으로 하는, 렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 부형제로서 만니톨+전분+유당+물 또는 포도당+PV K-30+아비셀+물 또는 유당+만니톨+Ac-di-sol+하이드록시프로필셀룰로로스+70% 에탄올 또는 전분+유당+알긴산나트륨+물 또는 만니톨+백당을 사용하는 것을 특징으로 하는, 렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 코팅액 제조를 위한 코팅기제로서 옥수수 단백추출물 및 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 대두단백, 소맥단백, 대두단백 또는 소맥단백의 유도체 및 그 가공물질, 메타크릴산-아크릴산에틸공중합체류, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈프탈레이트 (HPMCP), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 아세테이트숙시네이트 (HPMCAP), 하이드록시프로필메틸 아세테이트숙시네이트 (HPMCAS), 셀룰로즈아세테이트프탈레이트류 (CAP), 폴리비닐아세테이트프탈레이트, 알긴산염류, 셀락류, 카보폴류, 카복시메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈류, 에틸셀룰로즈류, 메틸셀룰로즈류, 키틴, 키틴산, 키틴 또는 키틴산의 가공물질, 한천, 카라기난 (Carrageenan), 펙틴(Pectin), 구아 검(Guar gum), 로우커스트 빈 검(Locust bean gum), 크산탄 검(Xanthan gum), 젤란 검(Gellan gum), 아라비아 검(Arabic gum), 콜리코트

(Kollicoat) MAE 30 DP, 탄소수 6 내지 12의 중쇄 지방산류 중에서 1 또는 2 이상 선택되는 코팅기제를 사용하는 것을 특징으로 하는, 렉틴 함유 천연물의 장용성 코팅용 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 렉틴을 함유하는 천연물은 겨우살이임을 특징으로 하는 장용성 코팅용 조성물.

【청구항 5】

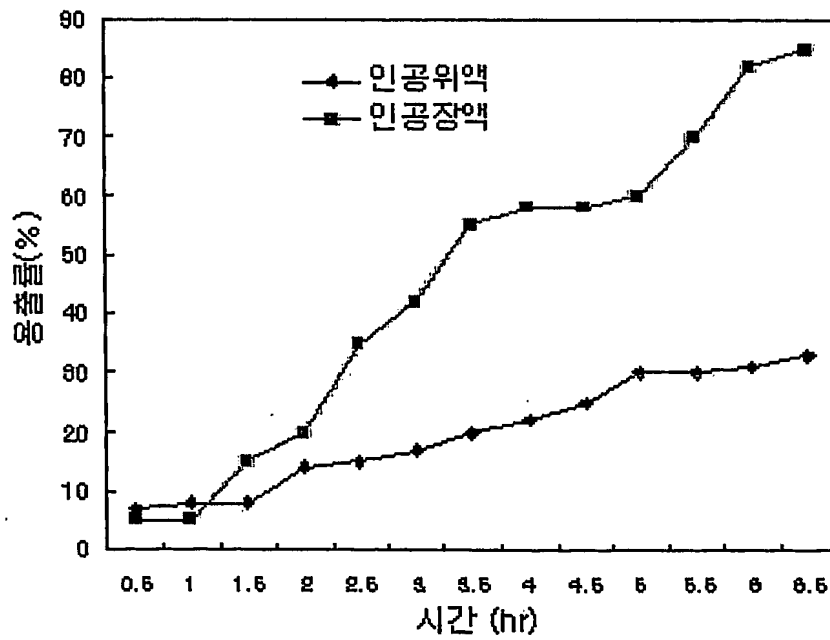
PLGA/ CH_2Cl_2 4ml, 1% 폴리비닐알콜 50ml, 계면활성제 Span80 2ml, 식용유 48ml, 1~4% 소듐 알지네이트 용액 8ml 및 0.02~0.2M CaCl_2 용액 60ml를 포함하는 것을 특징으로 하는 렉틴의 장용성 마이크로캡슐 제조용 조성물.

【도면】

【도 1】



【도 2】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.